

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年11月27日 (27.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/097034 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 31/202, A61P 1/16, 35/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/06116
- (22) 国際出願日: 2003年5月16日 (16.05.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-142862 2002年5月17日 (17.05.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日研化学株式会社 (NIKKEN CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0045 東京都中央区築地1丁目12番6号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 香川 雅孝 (KAGAWA, Masataka) [JP/JP]; 〒330-0835 埼玉県さいたま市大宮区北袋町1丁目346番地 日研化学株式会社 医薬研究所内 Saitama (JP). 佐野 哲朗 (SANO, Tetsuro) [JP/JP]; 〒330-0835 埼玉県さいたま市大宮区北袋町1丁目346番地 日研化学株式会社 医薬研究所内 Saitama (JP). 石橋 直人 (ISHIBASHI, Naoto) [JP/JP]; 〒330-0835 埼玉県さいたま市大宮区北袋町1丁目346番地 日研化学株式会社 医薬研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 03/097034 A1

(54) Title: TGF- α EXPRESSION INHIBITORS

(54) 発明の名称: TGF- α 発現抑制剤

(57) Abstract: TGF- α expression inhibitors and transformation inhibitors for hepatic and/or cirrhotic cells containing as the active ingredient polyprenyl compounds such as polyprenyl carboxylic acids (for example, 3,7,11,15-tetramethyl-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoic acid). These drugs are usable as inhibitors for the onset, recurrence (secondary carcinogenesis) or malignant alteration of cancer in the liver.

(57) 要約: ポリプレニルカルボン酸 (例えば3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸) などのポリプレニル系化合物を有効成分として含むTGF- α 発現抑制剤、並びに肝炎及び/又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤。肝臓における癌の発症、再発 (二次発癌)、又は悪性化の抑制剤として用いることができる。

明 細 書

T G F - α 発現抑制剤

技術分野

本発明は、ポリプレニル系化合物を有効成分とするトランスフォーミング（形質転換）増殖因子- α （transforming growth factor- α ；TGF- α ：以下、本明細書において「TGF- α 」と記載する場合がある。）発現抑制剤に関するものであり、該発現抑制による肝炎細胞又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤、並びに肝癌の発症、再発（二次発癌）又は悪性化抑制剤に関するものである。

背景技術

平成11年の悪性新生物による死亡数は29万6千人で死因の1位を占め、そのうち肝細胞癌による死者は3万人を超えている。その数は年々増えており、ここ20年間で約3倍に増加している。わが国で発生する肝細胞癌の主な原因として、90%以上はB型肝炎ウイルス（HBV：以下、本明細書において「HBV」と記載する場合がある。）又はC型肝炎ウイルス（HCV：以下、本明細書において「HCV」と記載する場合がある。）の持続感染（慢性肝炎）によるといわれている。また、肝癌はその治療後、年率約20～25%の再発（二次発癌）が認められ、予後不良の疾患である。そのため、肝癌の早期発見、早期治療と共に、今後の重要な課題として慢性肝炎からの肝発癌の抑制並びに肝癌治療後の再発の抑制が挙げられる。

トランスフォーミング（形質転換）増殖因子- α （TGF- α ）は、肝発癌及び肝癌細胞の悪性化（プロモーション／プログレッション）に深く関与していると考えられている増殖因子である。肝でのTGF- α 発現レベルは、ウイルス性肝炎における炎症の重篤度に関連しており、また、肝炎ウイルスによる肝硬変でのTGF- α の過剰発現が肝炎ウイルスの複製に関係があることも報告されている。実際、HBV及びHCVの感染による慢性肝疾患患者の肝組織では、健常人に比べてTGF- α の発現が高まっていることが確認されており、また、肝癌患者における癌組織及び癌

周囲の非癌部組織でも TGF- α の高い発現が認められることから、肝炎ウイルス感染から肝癌の発症・発達における過程で TGF- α が極めて重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

実験的には、ラット肝細胞のトランスフォーメーション（形質転換）は TGF- α の発現亢進に関連しており、肝化学発癌物質及び肝炎ウイルスにより形質転換した肝細胞で TGF- α が高レベルに発現することが確認されている。また、TGF- α を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、自然発生的に肝癌が高率に発症すると共に、本マウスにおいては化学発癌物質及び癌遺伝子による肝発癌の劇的な亢進が認められる。

このように、TGF- α は肝発癌及び肝癌細胞の悪性化に深く関与していることから、TGF- α を標的にして新しい肝癌治療戦略が成り立つことが提唱されている。

ウイルス性慢性肝炎患者から肝癌が発症する正確なメカニズムは明らかにされていないが、肝幹細胞（oval cell：以下、本明細書において oval cell と記載する場合がある。）が重要な役割を担っている可能性が指摘されている。すなわち、oval cell は慢性肝炎もしくは肝硬変の患者において増殖が見られ、肝病変が重篤になる程に oval cell の数が増えることが確認されている。これは、肝炎ウイルスが肝における慢性炎症を引き起こして oval cell の分裂増殖活性を高めることによるが、肝炎ウイルスは同時に oval cell に対して発癌イニシエーターとしても作用している。これらのことより、肝炎ウイルスによりイニシエーションを受けた oval cell が、慢性炎症によって分裂増殖活性が亢進し（プロモーション）、癌化（発癌）するメカニズムが示唆されている。

また、動物を用いた多くの肝化学発癌実験においても、肝癌が脱分化した肝細胞に由来していることを示す報告がある一方で、肝癌細胞のフェノタイプが oval cell と類似していることから oval cell を発生源とする肝発癌の可能性が指摘されている。

oval cell と TGF- α との関連についての研究報告も多い。TGF- α は oval cell の細胞分裂促進物質（mitogen）であり、oval cell 自身あるいは周囲肝組織で産生された TGF- α がそのレセプターである上皮増殖因子レセプター（epidermal

growth factor receptor ; EGFR) を介して oval cell の増殖を刺激する。また、ヒトにおけるウイルス性慢性肝炎で著明に認められる oval cell は、肝炎ウイルス感染の標的細胞であると同時に TGF- α の発現亢進を伴うことが確認されており、肝炎ウイルスが発癌の初期段階に作用 (イニシエーション) し、TGF- α がその後のプロモーターとして関与することにより、oval cell 自身が肝癌細胞へと移行する可能性が考えられる。

このように、oval cell におけるウイルスの存在と TGF- α 発現の相互作用が、oval cell を癌化に導くための重要な因子であると考えられる。同時に、oval cell 周囲の肝炎／肝硬変組織で過剰発現している TGF- α も、レセプターを介して oval cell の癌化を促進させている可能性が高い。これらのことより、ウイルス性慢性肝炎で認められる oval cell 内の TGF- α 発現を低下させると共に、肝炎／肝硬変組織における TGF- α 発現を抑制することは、肝癌の先駆細胞としての oval cell を沈静化させて肝発癌の制御に結びつく、極めて重要なメカニズムと考えられる。

以上述べたように、TGF- α は肝炎及び肝硬変細胞の形質転換、並びに肝臓における発癌及び肝癌細胞の悪性化に密接に関連しており、肝臓中の肝組織細胞及び oval cell において過剰発現状態にある TGF- α を制御することが、肝炎及び肝硬変細胞の形質転換抑制、並びに肝臓における発癌及び肝癌細胞の悪性化抑制に繋がる可能性が高い。

ポリプレニル系化合物の一つである (2E, 4E, 6E, 10E)-3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸 (開発コード「NIK-333」) は、レチノイン酸結合蛋白及びレチノイン酸受容体に対して親和性を示すことや、肝癌細胞における分化誘導作用及びアポトーシス誘導作用が知られている。臨床においては、NIK-333 は一年間の長期投与により肝癌根治治療後の再発を有意に抑制したことから、肝癌再発抑制作用を有することが確認されている。さらに、上記の投与中、肝機能障害及び他のレチノイドに見られる副作用は殆ど認められず、安全な薬剤である (引用文献 : N. Eng. J. Med. 334, 1561-1567 (1996))。

ポリプレニル系化合物が株化肝癌細胞の TGF- α の発現を抑制することは既に報告されている (引用文献 : Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 100-104 (1996))。

しかしながら、ポリプレニル系化合物が生体肝組織において、肝化学発癌物質投与により肝組織中で発現亢進した TGF- α を抑制すること、並びに肝癌の先駆細胞と考えられている oval cell における TGF- α 発現を抑制することは全く知られていない。

発明の開示

従って、本発明は TGF- α の発現抑制による肝炎及び／又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤、並びに肝臓における発癌抑制剤及び癌悪性化抑制剤等を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、肝炎及び／又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤（肝炎又は肝硬変の悪性化抑制剤）、並びに肝臓における発癌抑制剤及び癌悪性化抑制剤を見出すべく種々研究を重ねてきた。その結果、ポリプレニル系化合物が、肝化学発癌物質により形質転換した肝組織細胞における TGF- α の発現を抑制し、さらに肝癌の先駆細胞としての可能性が強く示唆されている oval cell における TGF- α の発現を抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ポリプレニル系化合物を有効成分とする TGF- α の発現抑制剤に関するものであり、ポリプレニル系化合物を有効成分として含む肝炎及び／又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤（肝炎又は肝硬変の悪性化抑制剤）に関するものである。さらに、本発明は、ポリプレニル系化合物を有効成分として含む TGF- α の発現抑制による肝炎細胞又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤、並びに肝癌の発症、再発（二次発癌）、又は悪性化の抑制剤に関するものである。

別の観点からは、上記の医薬の製造のためのポリプレニル系化合物の使用；ヒトを含む哺乳類動物において TGF- α の発現抑制により肝炎細胞又は肝硬変細胞の形質転換を抑制する方法であって、並びに TGF- α の発現抑制により肝臓における発癌又は癌細胞の悪性化を抑制する方法であって、ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；並びに肝炎細胞又は肝硬変細胞の形質転換を抑制する方法であって、並びに肝臓における癌の発症、再発（二次発癌）、又は悪性化を抑制する方法であって、抑制を必要とするヒトを含む

哺乳類動物にポリプレニル系化合物の抑制有効量を投与する工程を含む方法が本発明により提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、無処置動物の肝組織の写真を示す。TGF- α 陽性を示す oval cell の発現は全く認められない。

第2図は、対照群（肝化学発癌物質 3'-MeDAB のみを投与）の肝組織に発現した oval cell が、細胞質内に強い TGF- α 陽性所見（濃褐色の染色部分は TGF- α が発現していることを示す）を示す写真である。

第3図は、3'-MeDAB により発現した oval cell が NIK-333 80mg/kg/day 投与により TGF- α 弱陽性を呈し（濃褐色の染色部分が第2図に比べて少ないことを示す）、TGF- α 発現が低下していることを示す写真である。

第4図は、無処置動物の肝組織の写真を示す。TGF- α の発現は殆ど認められない。

第5図は、対照群（肝化学発癌物質 DEN のみを投与）の非腫瘍部肝組織における TGF- α 発現を示した写真である。中心静脈周囲の肝組織に TGF- α の強い陽性所見（濃褐色の染色部分は TGF- α が発現していることを示す）が認められる。

第6図は、DEN により中心静脈周囲の肝組織に発現した TGF- α が、NIK-333 80mg/kg/day 投与によりほぼ陰性化した像（濃褐色の染色部分が殆ど見られないことを示す）を示す写真である。

第7図は、無処置動物の肝組織の写真を示す。TGF- α の発現は殆ど認められない。

第8図は、DEN 投与による対照群の非腫瘍部肝組織における TGF- α 発現を示す写真である。中心静脈周囲の肝組織に TGF- α の強い陽性所見（濃褐色の染色部分は TGF- α が発現していることを示す）が認められる。

第9図は、DEN により中心静脈周囲の肝組織に発現した TGF- α が、NIK-333 80mg/kg/day 投与によりほぼ陰性化した像（濃褐色の染色部分が殆ど見られないことを示す）を示す写真である。

第10図は、無処置動物の肝組織の写真を示す。TGF- α 陽性を示す oval cell の発現は認められない。

第11図は、3'-MeDAB 投与により対照群の肝組織に発現した oval cell が、細胞質内に強い TGF- α 陽性所見を示す像(濃褐色の染色部分は TGF- α が発現していることを示す)を示す写真である。

第12図は、3'-MeDAB により発現した TGF- α 強陽性の oval cell の数が、NIK-333 80mg/kg/day 投与により減少していることを示す像(濃褐色に染まる細胞の数が第11図に比べて少ないことを示す)を示す写真である。

第13図は、無処置動物の肝組織の写真を示す。明らかな TGF- α 陽性所見を示す細胞は認められない。

第14図は、D-ガラクトサミン塩酸塩投与により対照群の肝組織に発現した oval cell が、細胞質内に強い TGF- α 陽性所見を示す像(濃褐色の染色部分は TGF- α が発現していることを示す)を示す写真である。

第15図は、D-ガラクトサミン塩酸塩により発現した oval cell が、NIK-333 200mg/kg/day 投与により TGF- α 弱陽性を呈する像(濃褐色の染色部分が第14図に比べて少ないことを示す)を示す写真である。TGF- α 発現が低下していることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明に使用されるポリプレニル系化合物としては、ポリプレニルカルボン酸である 3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸、ゲラニルゲラノイン酸 (GGA: geranyl geranoic acid)、フィタン酸 (phytanic acid) などを挙げることができ、更にポリプレニルカルボン酸エステル、ビタミンK1、ビタミンK2 などを挙げるができる。好ましい化合物としてはポリプレニルカルボン酸、特に 3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸を挙げる事ができ、最も好ましい化合物として(2E, 4E, 6E, 10E)-3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸 (NIK-333) を挙げる事ができる。

本発明で使用されるポリプレニル系化合物は、公知の方法（日本国特許公報昭 63-32058 号、J. Chem. Soc. (C), 2154 項, 1966 年）により合成することができる。

本発明の TGF- α 発現抑制剤は、通常、ポリプレニル系化合物を含む医薬組成物を調製し、経口又は非経口のいずれか適当な投与方法により投与することができる。経口投与に適する医薬組成物の形態としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、軟カプセル剤、丸剤、散剤、液剤などが挙げられ、非経口投与に適する医薬組成物の形態としては、例えば、注射剤、坐剤などが挙げられる。これらの医薬組成物は、ポリプレニル系化合物又はその薬理学上許容し得る塩と通常の製剤担体の 1 種又は 2 種以上とを用いて常法により調製することができる。

例えば、経口投与に適する医薬の場合には、製剤担体として、乳糖、ブドウ糖、コーンスターチ、ショ糖などの賦形剤、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ヒドロキシプロピルセルロースなどの崩壊剤、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、硬化油などの滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ゼラチン、アラビアゴムなどの結合剤、グリセリン、エチレングリコールなどの湿潤剤、その他必要に応じて界面活性剤、矯味剤などを使用して所望の医薬組成物を調製することができる。

また、非経口投与に適する医薬の場合には、製剤担体として、水、エタノール、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、寒天、トラガントガムなどの希釈剤を用いて、必要に応じて溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、保存剤、無痛化剤などを使用することができる。

本発明の TGF- α 発現抑制剤の投与量は、特に限定されないが、例えば、成人 1 日あたり経口投与の場合には 50~1200mg、好ましくは 300~900mg、非経口の場合には 1 日 1~1200mg、好ましくは 5~900mg の範囲である。上記の投与量をそれぞれ 1 日 1~3 回に分けて投与することにより所望の抑制効果が期待できる。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。以下の実施例では、ポリプレニル系化合物として (2E, 4E, 6E, 10E)-3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸 (以下、「NIK-333」と呼ぶ。) を用いた。

実施例 1

ラットでの肝化学発癌物質 3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼン (3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene : 3'-MeDAB) による TGF- α 陽性の oval cell 誘発に対する効果

動物は Fischer 系雄性ラット (F344/N Slc, 6 週齢) を用い、肝化学発癌物質 3'-MeDAB を固型飼料に 0.06% の割合に調製した飼料を 4 週間投与し、oval cell を誘発した。NIK-333 はダイズ油に懸濁し、80 mg/kg の用量を 3'-MeDAB と併行して 4 週間 (1 回/日) 経口投与した。なお、対照群にはダイズ油 (5 mL/kg) を経口投与した。3'-MeDAB 投与開始 4 週間後に麻酔下にて肝臓を摘出し 10%ホルマリン固定後パラフィン包埋を行い、抗 TGF- α 抗体を用いた免疫組織染色を施し、TGF- α 発現の程度を顕微鏡で観察した。

第 1 図～第 3 図は、3'-MeDAB の 4 週間投与により誘発された TGF- α 陽性の oval cell 誘発に対し、NIK-333 の 80mg/kg/day を 4 週間同時投与した場合の抑制効果を示した写真である (抗 TGF- α 抗体による免疫組織学的染色)。なお、同様な所見は同時に行われた他の動物においても得られている。

第 1 図は、無処置動物の肝組織を示す。TGF- α 陽性を示す oval cell の発現は全く認められない。

第 2 図は、対照群 (3'-MeDAB のみを投与) の肝組織に発現した oval cell における細胞質内の強い TGF- α 陽性所見を示す。

第 3 図は、3'-MeDAB により発現した oval cell が、NIK-333 80mg/kg/day 投与により TGF- α 弱陽性を呈し、TGF- α 発現が低下していることを示す。

上記と同一の試験における別の部位の写真撮影を行い、第 10 図～第 12 図に

示す結果を得た。

第10図は、無処置動物の肝組織を示す。TGF- α 陽性を示す oval cell の発現は認められない。

第11図は、3'-MeDAB 投与により対照群の肝組織に発現した oval cell における細胞質内の強い TGF- α 陽性所見を示す。

第12図は、3'-MeDAB により発現した TGF- α 強陽性の oval cell の数が、NIK-333 80mg/kg/day 投与により減少していることを示す。

実施例2

ラットでの肝化学発癌物質N-ニトロソジエチルアミン (N-Nitrosodiethylamine : DEN) 投与後の非腫瘍部肝組織における TGF- α 発現に対する効果

動物は Fischer 系雄性ラット (F344/N Slc、6 週齢) を用い、肝化学発癌物質 DEN を 5 週間飲水投与 (濃度 : 40 ppm) し、その後 15 週間通常の飲水で飼育し肝細胞癌を誘発した。NIK-333 はダイズ油に懸濁し、80 mg/kg の用量を DEN 投与終了 1 週間後より 14 週間 (1 回/日) 経口投与した。なお、対照群にはダイズ油 (5mL/kg) を経口投与した。DEN 投与開始 20 週間後に麻酔下にて肝臓を摘出し、10%ホルマリン固定後パラフィン包埋を行い、抗 TGF- α 抗体を用いた免疫組織染色を施し、TGF- α 発現の程度を顕微鏡で観察した。

第4図～第6図は、DENの5週間処置後に1週間休薬し、続いてNIK-333 80mg/kg/dayを14週間投与した場合の非腫瘍部肝組織における TGF- α 発現に対する抑制効果を示す写真である (抗 TGF- α 抗体による免疫組織染色)。なお、同様な所見は同時に行われた他の動物においても得られている。

第4図は、無処置動物の肝組織を示す。TGF- α の発現は殆ど認められない。

第5図は、対照群 (DEN のみを投与) の非腫瘍部肝組織における TGF- α 発現を示す。中心静脈周囲の肝組織に TGF- α の強い陽性所見が認められる。

第6図は、DEN により中心静脈周囲の肝組織に発現した TGF- α が、NIK-333 80mg/kg/day 投与によりほぼ陰性化した結果を示す。

上記と同一の試験における別の部位の写真撮影を行い、第7図～第9図に示す

結果を得た。

第7図は、無処置動物の肝組織を示す。TGF- α の発現は殆ど認められない。

第8図は、DEN投与による対照群の非腫瘍部肝組織におけるTGF- α 発現を示す。中心静脈周囲の肝組織にTGF- α の強い陽性所見が認められる。

第9図は、DENにより中心静脈周囲の肝組織に発現したTGF- α が、NIK-333 80mg/kg/day投与によりほぼ陰性化した結果を示す。

実施例3

ラットでのD-ガラクトサミン塩酸塩により誘発した oval cell における TGF- α 発現に対する効果

動物はSD系雄性ラット (Crj/CD(SD)、6週齢) を用い、生理食塩水で200mg/mLに調製したD-ガラクトサミン塩酸塩5mL/kgを1回腹腔内投与し、oval cellを誘発した。NIK-333はダイズ油に懸濁し、200mg/kgの用量を1~6日間経口投与した。なお、対照群にはダイズ油(2mL/kg)を経口投与した。投薬開始翌日より7日目まで経時的に麻酔下にて肝臓を摘出し、10%ホルマリン固定後パラフィン包埋を行い、抗TGF- α 抗体を用いた免疫組織染色を施し、TGF- α 発現の程度を顕微鏡で観察した。

第13図~第15図は、D-ガラクトサミン塩酸塩の1回投与により誘発された oval cell における TGF- α 発現に対し、NIK-333の200mg/kg/dayを4日間投与した場合の抑制効果を示す写真である(抗TGF- α 抗体による免疫組織染色)。なお、同様な所見は同時に行われた他の動物においても得られている。

第13図は、無処置動物の肝組織を示す。明らかなTGF- α 陽性所見を示す細胞は認められない。

第14図は、D-ガラクトサミン塩酸塩投与により対照群の肝組織に発現した oval cell において、細胞質内に強いTGF- α 陽性が認められた結果を示す。

第15図は、D-ガラクトサミン塩酸塩により発現した oval cell が、NIK-333 200mg/kg/day投与によりTGF- α 弱陽性を呈し、TGF- α 発現が低下している結果を示す。

産業上の利用可能性

ポリプレニル系化合物は、肝炎細胞又は肝硬変細胞の形質転換、あるいは肝臓における発癌又は癌細胞の悪性化に関与している TGF- α を抑制することから、肝炎又は肝硬変細胞の形質転換抑制として、例えば肝炎細胞又は肝硬変の悪性化抑制剤として用いることができ、並びに肝臓における癌の発症、再発（二次発癌）、又は悪性化の抑制剤として有用である。

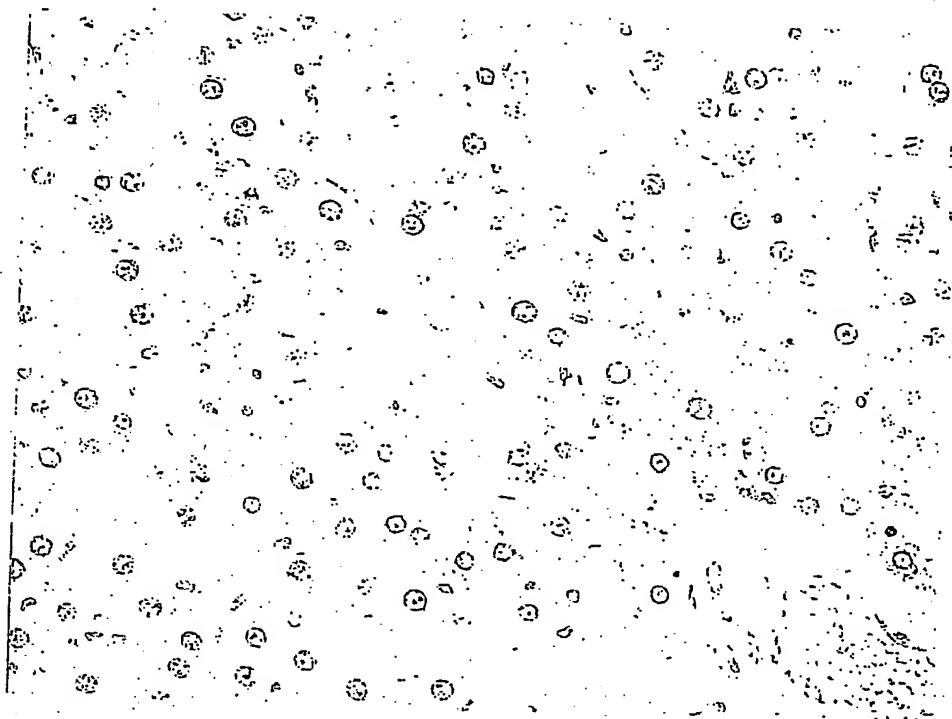
請求の範囲

1. ポリプレニル系化合物を有効成分として含む TGF- α 発現抑制剤。
2. ポリプレニル系化合物がポリプレニルカルボン酸である請求の範囲第 1 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
3. ポリプレニルカルボン酸が 3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸である請求の範囲第 2 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
4. ポリプレニルカルボン酸が (2E, 4E, 6E, 10E)-3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸である請求の範囲第 2 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
5. 肝炎及び／又は肝硬変細胞の形質転換抑制のために用いる請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれか 1 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
6. 肝癌の発症、再発（二次発癌）、又は悪性化の抑制のために用いる請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれか 1 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
7. 薬学的に許容されうる製剤担体を含有する医薬組成物の形態である請求の範囲第 1 項ないし第 6 項のいずれか 1 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
8. 経口投与のための医薬組成物である請求の範囲第 7 項に記載の TGF- α 発現抑制剤。
9. ポリプレニル系化合物を有効成分として含む肝炎細胞及び／又は肝硬変細胞の形質転換抑制剤。
10. ポリプレニル系化合物がポリプレニルカルボン酸である請求の範囲第 9 項に記載の形質転換抑制剤。
11. ポリプレニルカルボン酸が 3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸である請求の範囲第 9 項に記載の形質転換抑制剤。
12. ポリプレニルカルボン酸が (2E, 4E, 6E, 10E)-3, 7, 11, 15-テトラメチル-2, 4, 6, 10, 14-ヘキサデカペンタエン酸である請求の範囲第 9 項に記載の形質転換抑制剤。
13. 薬学的に許容されうる製剤担体を含有する医薬組成物の形態である請求の

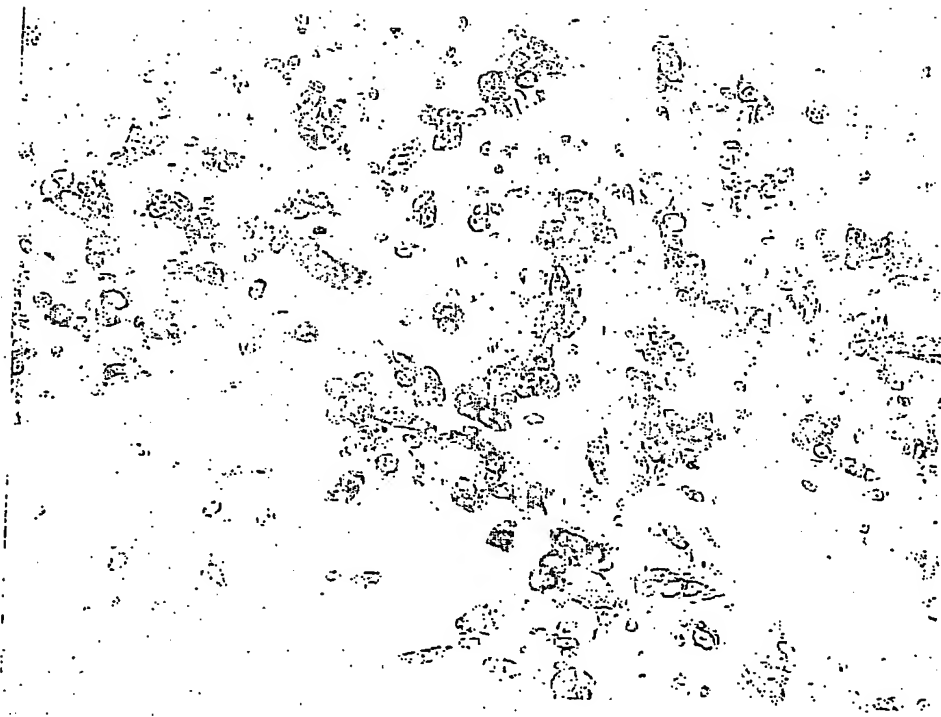
範囲第9項ないし第11項のいずれか1項に記載の形質転換抑制剤。

14. 経口投与のための医薬組成物である請求の範囲第13項に記載の形質転換抑制剤。

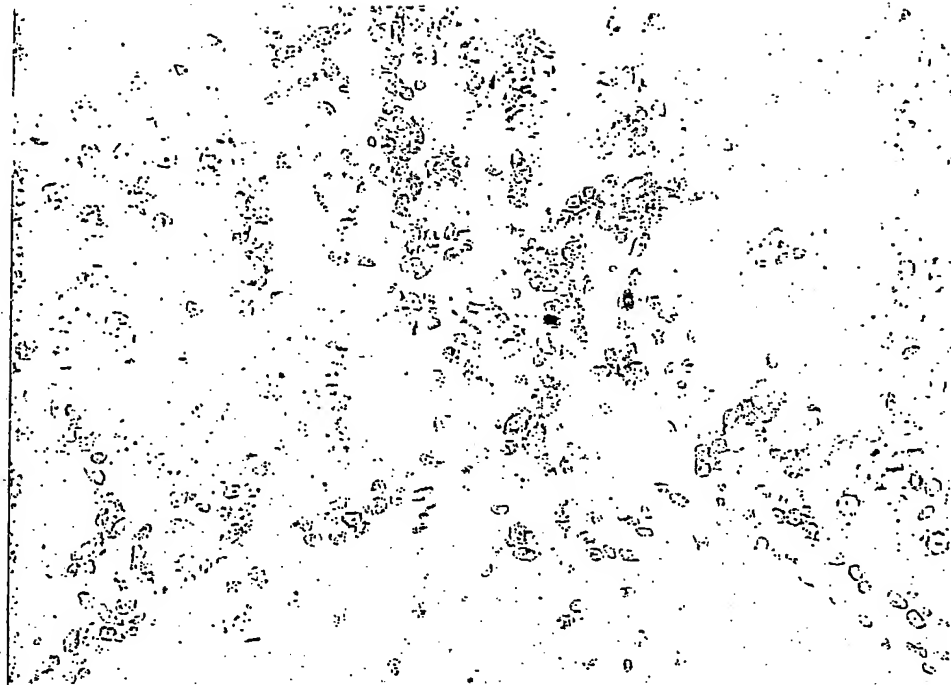
第1図



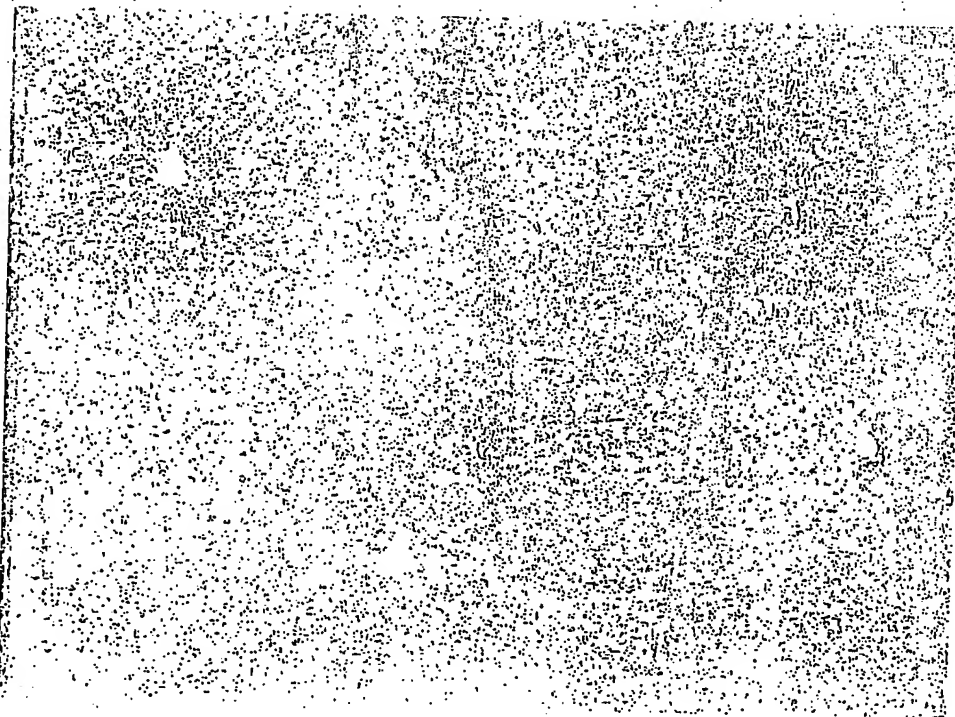
第2図



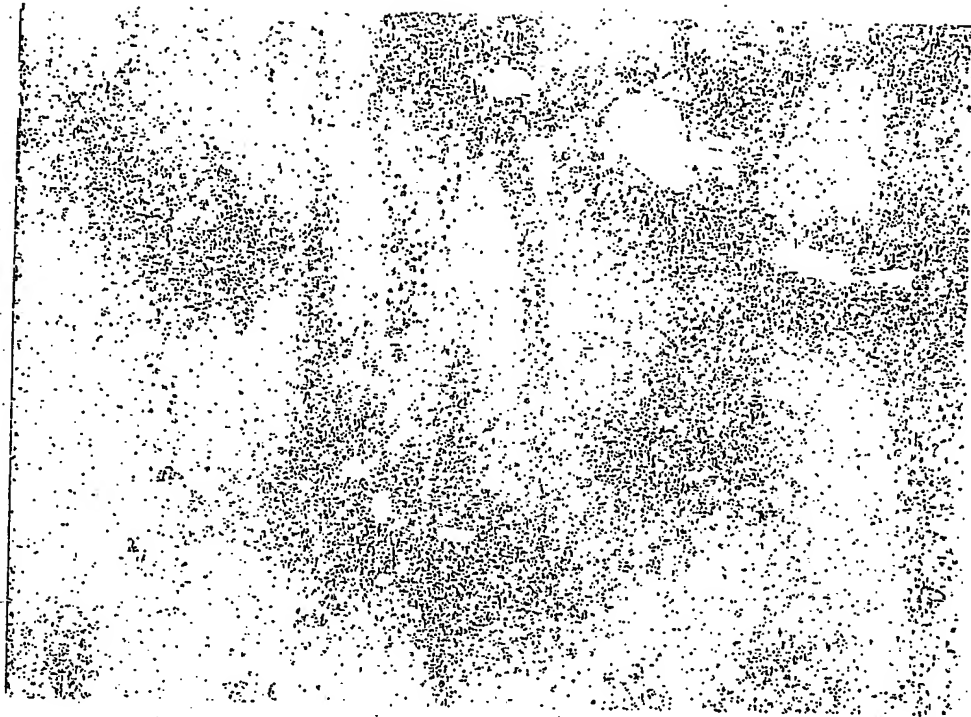
第3図



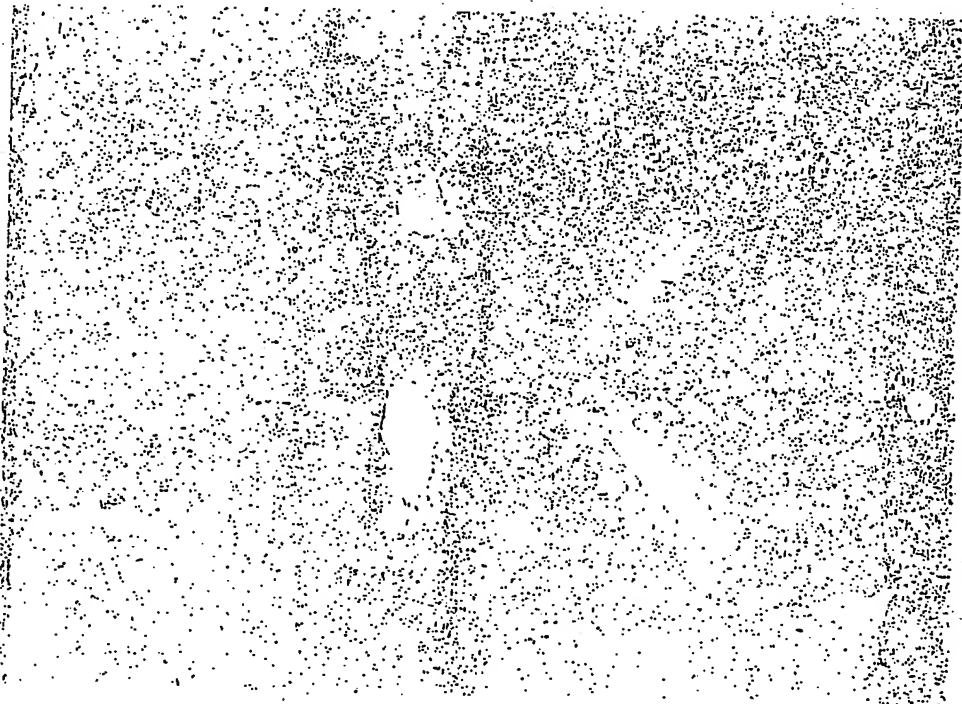
第4図



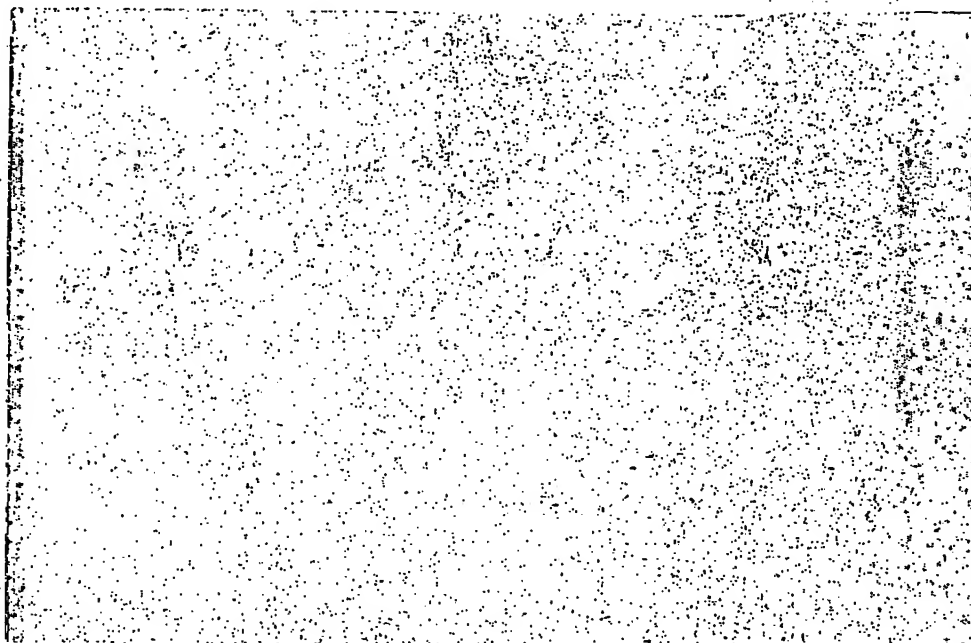
第5図



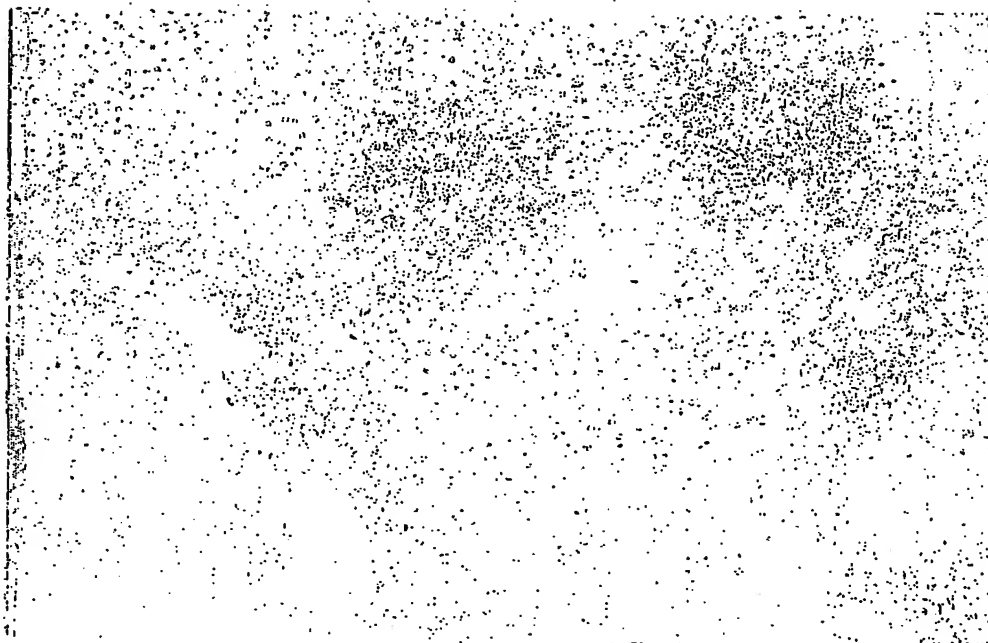
第6図



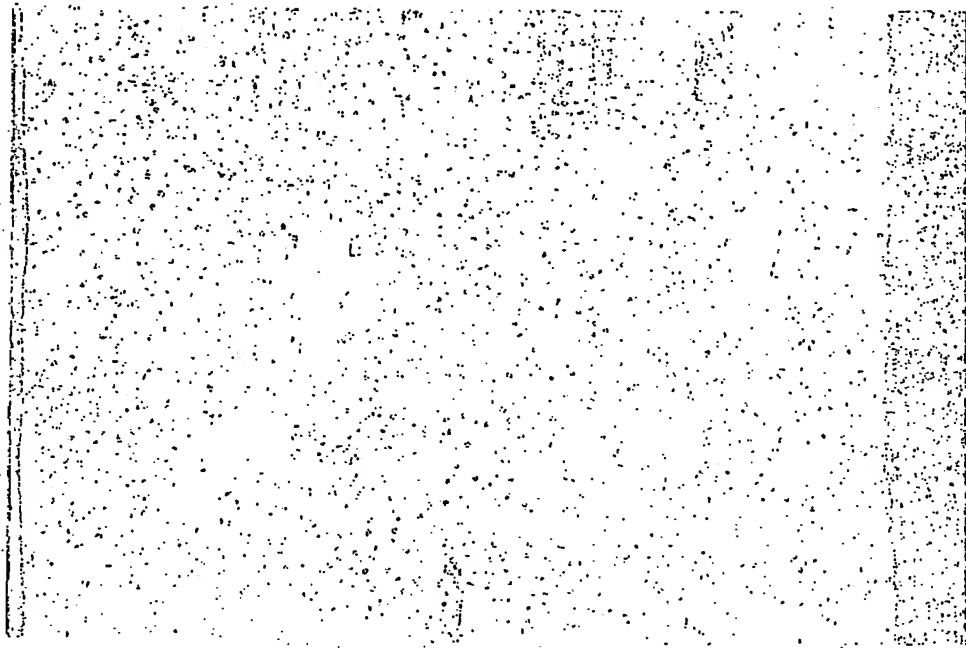
第7図



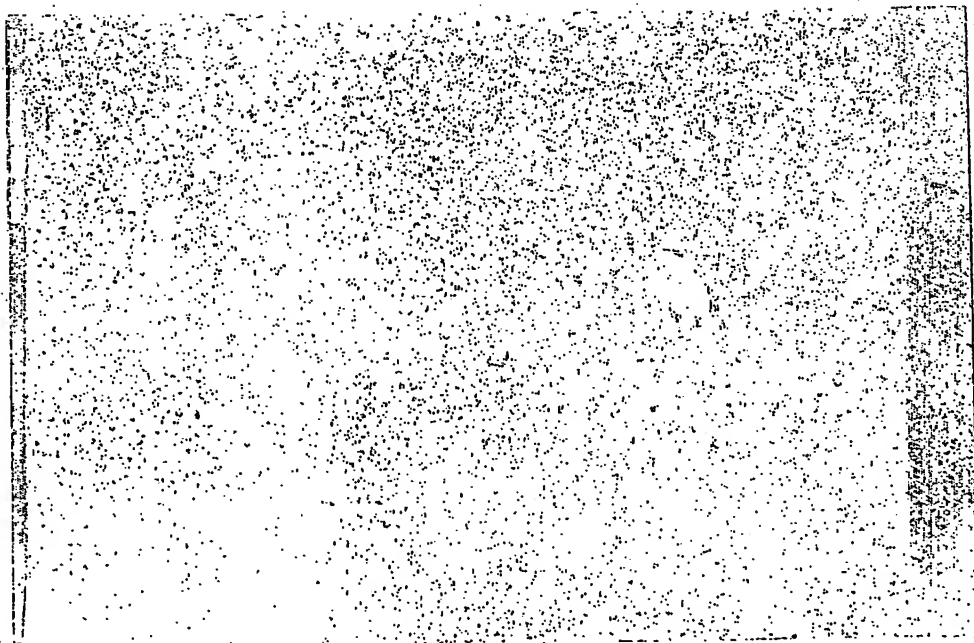
第8図



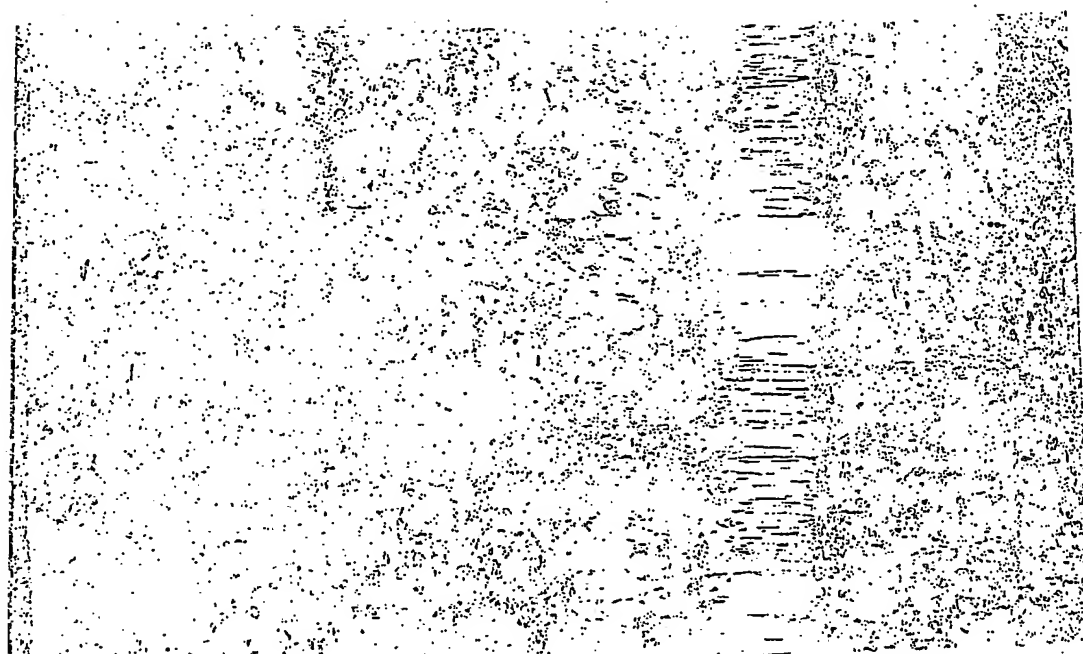
第 9 図



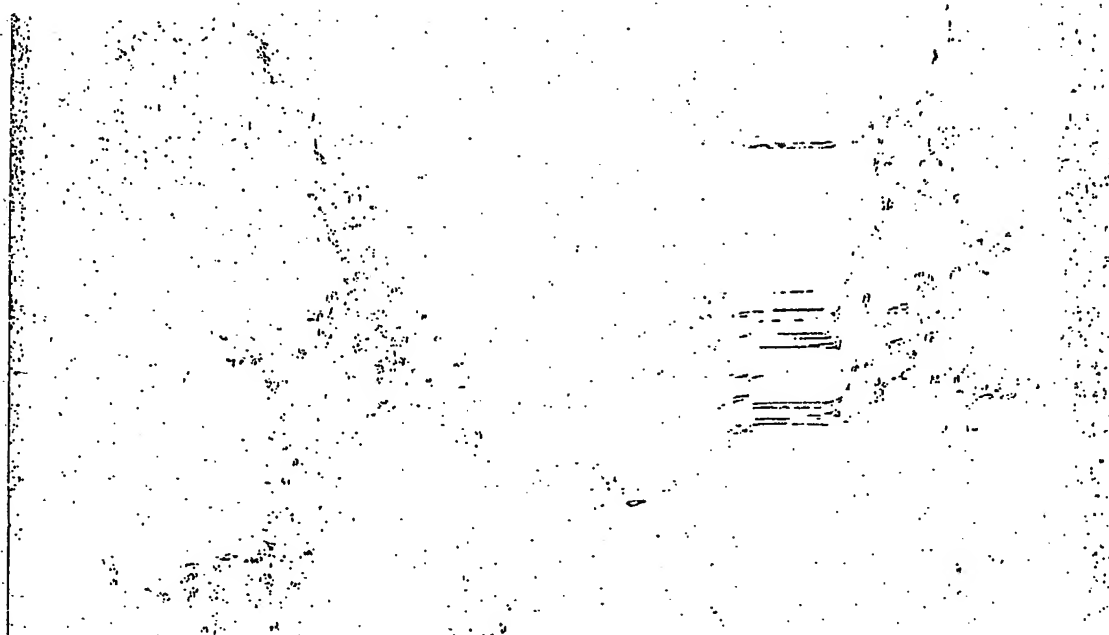
第 10 図



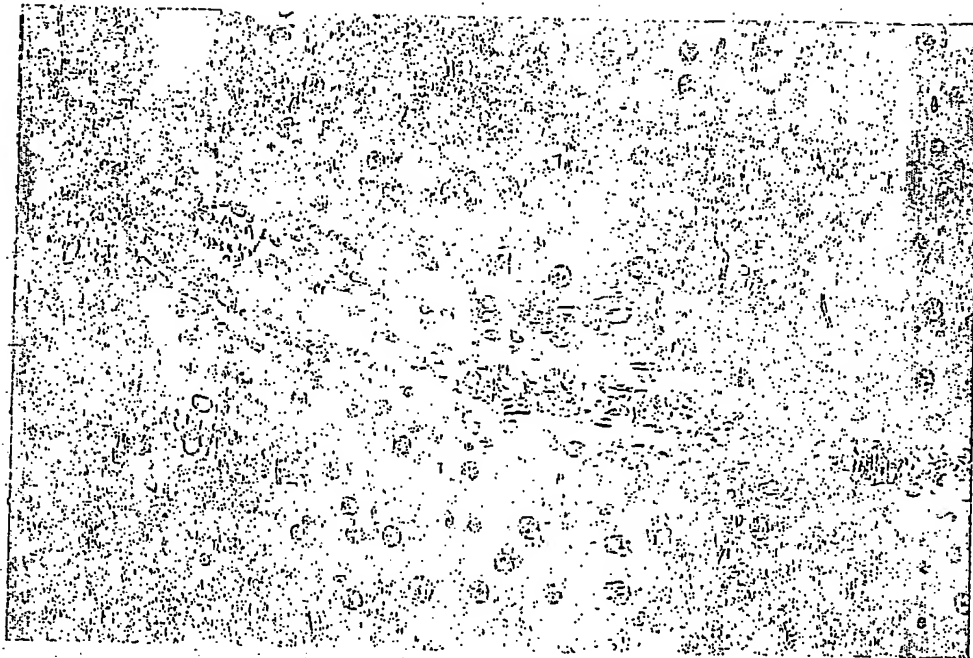
第1 1 図



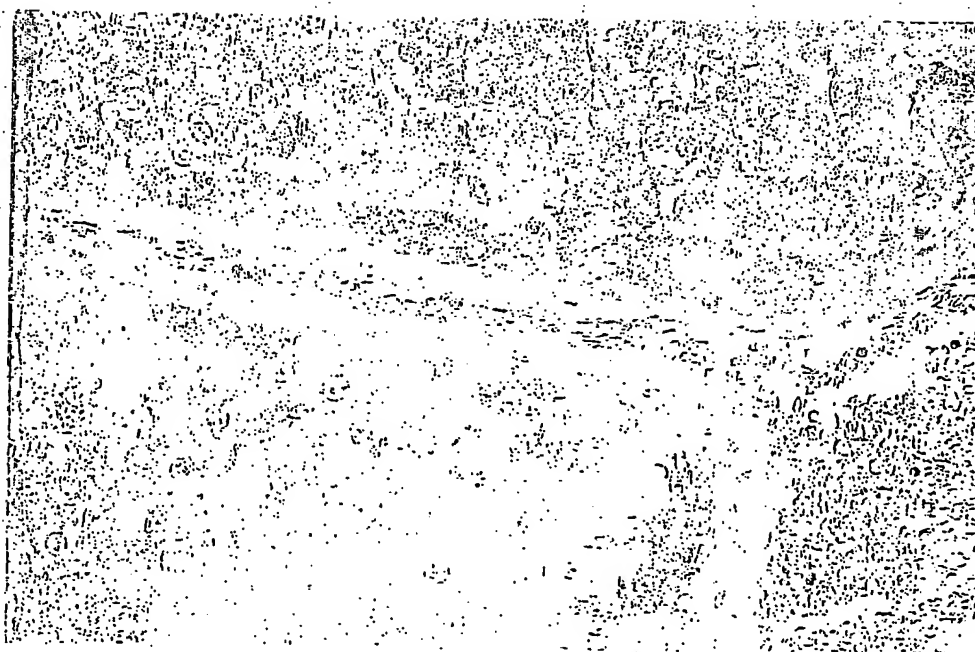
第1 2 図



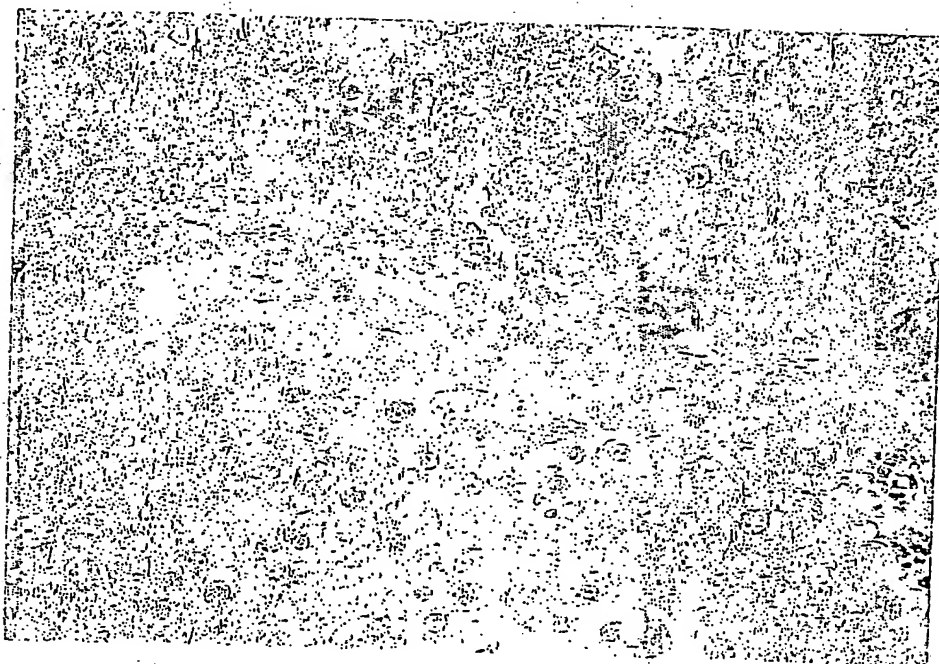
第13図



第14図



第15図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.